

「生物の発生・分化・再生」
平成12年度採択研究代表者

岡本 仁

((独) 理化学研究所 脳科学総合研究センター 発生遺伝子制御研究チーム
チームリーダー 修復機構研究グループ ディレクター)

「Genetic dissectionによる神経回路網形成機構の解析」

1. 研究実施の概要

人を含めた多くの動物で全ゲノムの配列が明らかになりつつあり、遺伝子の転写部位に関してはおおよそ予測がつく時代を迎えつつある。しかしながら、個々の遺伝子産物が複雑な生命現象のなかでどのような機能を担うのかという問題を解明するためには、生命現象との対応を調べる必要があり、ゲノム配列から予測される遺伝子とその機能を迅速に対応づけるシステムを確立することが急務となっている。脊椎動物の全遺伝子のうち大多数が脳で発現しているといわれるが、これまでに機能がわかっているものはむしろわずかにすぎない。申請者は、脳を構成する神経細胞が分化し神経回路を形成する過程に関与する遺伝子を系統的に同定するために、ゼブラフィッシュを用いて神経回路網（特に運動神経）の形成に異常を持つ突然変異体の大規模スクリーニングを開始している。

本研究では、そのスクリーニングの結果既に得られた突然変異と、将来得られる突然変異を用いて、それらの原因遺伝子をクローニングすることを第一の目的とする。更に申請者は最近、ゼブラフィッシュ胚において、任意の遺伝子を任意の時期と組織で発現誘導できる効率的な方法を開発した。この方法を用い、遺伝子の異所性発現を行うことによって、中脳から後脳の形成に関わる遺伝子の機能解析とスクリーニングを行うことを第二の目的とする。

2. 研究実施内容

我々は、脳の神経細胞の分化の重要なキープポイントごとに働く遺伝子をどこまで包括的に同定することが可能かを、ゼブラフィッシュの運動神経細胞、感覚神経細胞、側線神経細胞を材料に、突然変異体の系統的単離によって解析を試みてきた。平成15年度までの研究で、我々は1171 F2ファミリー、1817ゲノムのスクリーニングを終え、後脳と脊髄の運動神経細胞、感覚神経細胞、側線神経細胞の分化と軸索伸展に異常を示す突然変異を同定した。その結果、Is11-GFPトランスジーンの発現パターンの異常から27種類、神経軸索の抗体染色のパターンの異常から45種類、行動異常から2種類を同定することができた。

後脳の三叉運動神経細胞と顔面運動神経細胞や側線神経節細胞に限れば、神経細胞が誕

生し、軸索を伸展して、途中で伸展経路を変更し、標的の細胞と正しく結合するまでの各ステップに対して、特異的に影響をおよぼす突然変異を単離することに成功した。

我々のこれまでの経験では、神経軸索の軸索伸展に異常を示す突然変異は、遺伝的背景の違いの影響を受けやすく、世代を経ると形質が出現しなくなることがあったので、安定した突然変異系統として確立するためには交配を重ねる必要が有ることが分かってきた。現在までに、以下の33種類の突然変異体は、outcrossによって世代を経ても表現型が安定しており、その高い特異性から比較的容易に野生型と区別できる突然変異体系統として確立済み、または確立中である。

A. 後脳または脊髄の運動神経細胞の分化に特異的異常が見られる突然変異体（括弧内の数字はアレルの数）

1. *spirited away* (1), 後脳の運動神経細胞が欠失している。
2. *lullaby* (1), 脊髄の運動神経細胞が欠失している。
3. *ementaler* (1), 動眼、滑車運動神経細胞と、三叉運動神経細胞の後核のみが選択的に欠損している。

B. 感覚神経細胞の分化に特異的異常が見られる突然変異体

1. *mujina* (1), 側線神経が選択的に欠損している。
2. *non-epibranchial* (3), epibranchial placode由来の感覚神経節が欠損している。

C. 後脳運動神経細胞の移動に特異的異常が見られる突然変異体

1. *landlocked* (3), *off-raod* (4), *off-limit* (1), 顔面運動神経細胞の第4菱脳節から第6菱脳節への細胞移動が選択的に欠損している。
2. *freeze frame* (1), 三叉運動神経細胞の後核の放射方向への移動が選択的に欠損している。
3. *alluvion* (1), 移動する迷走運動神経細胞が、本来の位置で止まらないで行き過ぎてしまう。
4. *double vagus* (1), 一部の迷走運動神経細胞の移動が、途中で止まってしまう。

D. 脳神経の広範な軸索伸展異常が見られる突然変異体

1. *ephemeral* (2), 後脳の運動神経が、後脳から伸び出ることができない。色素細胞の分化異常を伴う。
2. *full-moon* (1), 脳神経は総べて正常に生まれるが、軸索が脳の表面でなく、深部に伸展する。耳胞の異常拡大を伴う。

E. 三叉または顔面神経細胞の軸索伸展に特異的異常が見られる突然変異体

1. *no entry* (1), 三叉運動神経細胞の軸索のみが、下顎筋に到達しない。下顎筋群に形態的異常は見られない。
2. *faceless* (1), 顔面運動神経細胞の軸索のみが、下顎筋に到達しない。下顎筋群に形態的異常は見られない。
3. *blind alley* (1), *keep off* (1), *dead end* (1), *stop signal* (1), *no trespassing* (1), 三叉運動神経細胞と顔面運動神経細胞の両方の軸索が、下顎

筋に到達しない。下顎筋群に形態的異常は見られない。

4. *mekong* (1), *rio grande* (3), *rubicon* (1), 三叉運動神経の軸索が、第1鰓弓由来の下顎筋と、第2鰓弓由来の下顎筋との境界 (mandibulo-hyoid boundary, MHB) を越えて伸展することができない。

5. *sidewalk* (1), *casefire* (1), *waterloo bridge* (1), *sagittarius* (1), *taurus* (1), *long goodbye* (1), 三叉運動神経の軸索が、MHBで2分岐できないで、同側のみを伸展する。

F. 脊髄運動神経細胞の軸索伸展に特異的異常が見られる突然変異体

1. *waverer* (1), 脊髄運動神経細胞の軸索が、体節境界と無関係に伸展する。

G. 側線神経の伸展に特異的異常が見られる突然変異体

1. *walk off* (1), 体幹筋の形成異常は見られないが、側線神経が正常の伸展経路から逸れてしまう。

2. *slow temp* (1), 側線神経が伸展する過程で、不規則に分岐する。

3. *halt* (1), 側線神経の伸展が途中でとまる。

4. *walk away* (1), 側線神経の伸展は途中で止まるが、感覚受容器細胞は正常に後方に移動する。

H. 脳のパターン形成に特異的異常が見られる突然変異体

1. *kaitou* (1), 視蓋から脊髄にかけて最背側の天板 (roof-plate) が神経組織に運命転換している。

2. *dragon* (1), *you* (1), 神経系の正中シグナルが欠損している。

3. *aboutface* (1), 脳と臓器の左右非対称性が、逆転する。

1 : *landlocked*, *off-raod*に関しては、これまでに原因遺伝子を明らかにすることができた。今後、これらの遺伝子産物と顔面運動神経細胞の移動との関係を明らかにするために、正常と突然変異での遺伝子産物の抗体を作製し局在の違いを調べる。

2 : *non-epibranchial*, *freeze frame*, *ephemeral*, *kaitou*, *you*に関しては、これまでにマッピングによってBACライブラリー1個でカバーできる範囲内まで、原因遺伝子を局在することができた。最近サンガーセンターから発表されたversion3のゲノム情報には、不備や不整合性が極めて多く、いずれも原因遺伝子の最終同定には至っていない。今後、理研横浜研究所のゲノム基盤施設 (榊ディレクター、豊田上級研究員) の協力を得て、原因遺伝子を含むBACライブラリーの塩基配列の決定を行い、原因遺伝子の同定を目指す予定である。

3 : E, F群の突然変異に関しては、今後、標的筋に形態的異常がないか、神経筋結合が正しく作られているか、等の詳細な検討を行い、軸索伸展の異常が、運動神経細胞のサブタイプの分化異常によるものかどうかを調べる予定である。これらの諸要素を考慮して、原因遺伝子の同定を行うための優先順位を決定し、順位の高いものからマッピングを行う予定である。

4 : E, F群以外の突然変異に関しては、それぞれの突然変異に関して、BACライブラリー

1 個分の中に原因遺伝子を挟み込むことができるように、マッピングを行い、ゲノム情報が不備な領域の場合、理研横浜研究所のゲノム基盤施設の助力を得て、該当するBACライブラリーの塩基配列を決定し、原因遺伝子の同定を目指す予定である。

[2] ゼブラフィッシュ網膜形成異常変異体の解析

本スクリーニングの結果、網膜層構造に異常を示す変異体27系統、水晶体に異常を示す系統を9系統、視細胞変性を示す変異体を3系統、眼の形態に異常を示す変異体を6系統同定し、維持のため確立している。政井グループはこれらの変異体の解析を行い、網膜における神経細胞分化のメカニズムを明らかにする。昨年度までの研究では、突然変異体 *lybrinth* を解析し、網膜の接着帯の形成やアマクリン細胞の樹状突起の伸展に異常を示すこと、接着分子であるN-cadherinが原因遺伝子であることを明らかにした。これにより、N-cadherinの神経回路構築の機能が明らかになった。またこの変異体以外には、以下の変異体に焦点を当て解析を進めている。

I. 網膜前駆細胞が過剰に増殖する変異体 *ascending and descending (add)*

J. 網膜神経細胞が細胞死を起こす変異体 *pinball eye (piy)*

K. 視細胞変性を示す変異体 *twilight (tli)*, *eclipse (els)*, *corona (coa)*

L. 眼杯の形成異常を示す変異体 *detached (det)*

1. *add*変異体では前駆細胞が過剰に増殖し、神経細胞がほとんど分化してこないこと、*add*変異は細胞自律的に振舞うことを明らかにした。このことから、*add*遺伝子は前駆細胞が細胞周期から出るときに必要な蛋白質をコードする可能性が高いことが明らかになった。
2. JとKに属する *piy*, *tli*, *els*, *coa*変異体に関しては、既に変異の染色体上へのマッピングを行い、1cM以下まで絞り込んだ。

[3] ゼブラフィッシュ胚における異所性発現技術の開発と応用

我々がこれまでに開発した、発生過程のゼブラフィッシュ胚の任意の場所で、任意の遺伝子の発現を誘導するための技術を使って、ゼブラフィッシュ前脳の形成における遺伝子カスケードと、手綱核-脚間核間軸索投射における左右差の機構を研究した。

3. 研究の実施体制

岡本グループ (代表: 岡本仁)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・発生遺伝子制御研究室

研究実施項目: ゼブラフィッシュ神経回路網形成機構の解析

概要: 1) 突然変異系統のスクリーニング、2) 運動・感覚神経と中枢神経の分化異常突然変異の解析、3) Caged RNA技術の改良と応用

政井グループ (代表: 政井一郎)

理化学研究所・政井独立主幹研究室

研究実施項目: ゼブラフィッシュ網膜形成異常突然変異の解析

概要：岡本グループと共同で突然変異スクリーニングを行い、そのうちで網膜形成異常突然変異の解析を行う。

東海林グループ（代表：東海林互）

東北大学加齢研究所

研究実施項目：側線神経系の分化異常の突然変異の解析

概要：岡本グループのスクリーニングによって単離された突然変異体のうちで、側線神経系の分化に異常を示す突然変異の解析を行う。

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

[岡本グループ]

- Okamoto H, Hirate Y, Ando H.

Systematic identification of factors in zebrafish regulating the early midbrain and cerebellar development by ordered differential display and caged mRNA technology.

Front Biosci. 1;9:93-9, 2004

- Masai I, Lele Z, Yamaguchi M, Komori A, Nakata A, Nishiwaki Y, Wada H, Tanaka H, Nojima Y, Hammerschmidt M, Wilson SW, Okamoto H. Related Articles, Links

N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neurites.

Development. 130(11):2479-94, 2003.

- Ando H, Okamoto H.

Practical procedures for ectopic induction of gene expression in zebrafish embryos using Bhc-diazo-caged mRNA.

Methods Cell Sci.;25(1-2):25-31, 2003

- Hutson LD, Juryneć MJ, Yeo SY, Okamoto H, Chien CB.

Two divergent slit1 genes in zebrafish.

Dev Dyn. 228(3):358-69, 2003

- Hirate Y, Okamoto H, Yamasu K.

Structure of the zebrafish fasciclin I-related extracellular matrix protein (betaig-h3) and its characteristic expression during embryogenesis.

Gene Expr Patterns. 3(3):331-6, 2003

[東海林グループ]

- Xiao, T., Shoji, W., Zhou, W., Su, F., and Kuwada, J.Y.

Transmembrane Sema4E guides branchiomotor axons to their targets in zebrafish, J

Neurosci. 23 p4190-4198, 2003

- Shoji, W., Isogai, S., Sato-Maeda M., Obinata M., and Kuwada, J. Y., Semaphorin 3A1 regulates angioblast migration and vascular development in zebrafish embryos, Development, 130 p3227-3236, 2003
- Liu, Y., Berndt, J., Su, F., Tawarayama, H., Shoji, W., Kuwada, J. Y. and Halloran, M. C., Semaphorin3D guides retinal axons along the dorsal-ventral axis of the tectum., J Neurosci., 24 p310-318, 2004
- Ober EA, Olofsson B, Makinen T, Jin SW, Shoji W, Koh GY, Alitalo K, Stainier DY., Vegfc is required for vascular development and endoderm morphogenesis in zebrafish., EMBO Rep. 1 p78-84, 2004

[政井グループ]

- Masai, I., Lele, Z., Yamaguchi, M., Komori, A., Nakata, A. Nishiwaki, Y., Wada, H., Tanaka, H., Nojima, Y., Hammerschmidt, M., Wilson, S. W. and Okamoto, H. (2003). N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neuritis. Development 130: 2479-2494.

(2) 特許出願

なし